

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

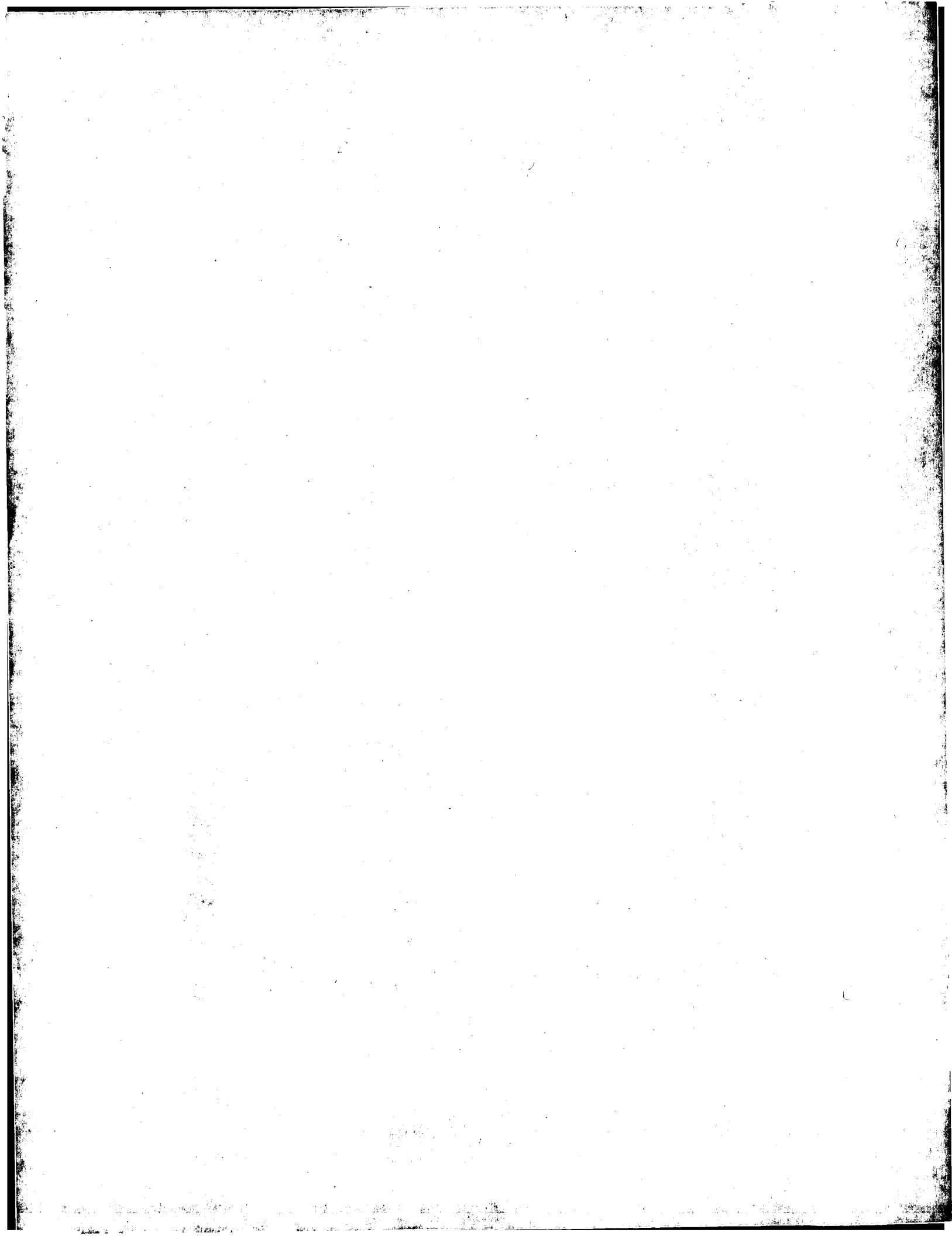
Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN(11)Publication number : **2001-086982**(43)Date of publication of application : **03.04.2001**

(51)Int.Cl.

C12N 5/02
A61K 38/22
A61K 45/00
A61P 19/08
A61P 19/10
A61P 35/00
A61P 43/00
C12Q 1/04
G01N 33/15
G01N 33/50
G01N 33/566

(21)Application number : **2000-191075**(71)Applicant : **NIIIDA SHUNPEI
MURAKAMI KAZUO**(22)Date of filing : **21.06.2000**(72)Inventor : **NIIIDA SHUNPEI
MAEDA NORIHIKO**

(30)Priority

Priority number : **11203899** Priority date : **16.07.1999** Priority country : **JP****(54) BONE RESORPTION REGULATOR**

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a medicine for regulating the bone resorption caused by osteoclast, and further to provide a method for screening the medicine.

SOLUTION: It is discovered that a vascular endothelial growth factor(VEGF) has activities for promoting formation and existence of the osteoclast. The activities is mediated by a vascular endothelial growth factor receptor type 1 (VEGFR-1). The decrease of the osteoclast is successfully carried out by inhibiting the activation of the VEGFR-1 of M-CSF-deficient mouse. The formation and existence of the osteoclast is regulated by using the medicine for regulating the activation of the VEDFR-1, and thereby the therapy of the disease accompanying the abnormality of the bone resorption become possible.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision]

of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-86982

(P2001-86982A)

(43) 公開日 平成13年4月3日 (2001. 4. 3)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/02		C 1 2 N 5/02	
A 6 1 K 38/22		A 6 1 K 45/00	
45/00		A 6 1 P 19/08	
A 6 1 P 19/08		19/10	
19/10		35/00	
審査請求 未請求 請求項の数23 O L (全 16 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願2000-191075 (P2000-191075)	(71) 出願人	599100545 新飯田 俊平 広島県広島市南区宇品神田3丁目8-24-301
(22) 出願日	平成12年6月21日 (2000. 6. 21)	(71) 出願人	000203254 村上 和雄 茨城県つくば市観音台1丁目37-16
(31) 優先権主張番号	特願平11-203899	(72) 発明者	新飯田 俊平 広島県広島市南区宇品神田3丁目8-24-301
(32) 優先日	平成11年7月16日 (1999. 7. 16)	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志 (外1名)
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 骨吸収調節薬

(57) 【要約】

【課題】 破骨細胞による骨吸収を調節する薬剤およびそのスクリーニング方法を提供することを課題とする。

【解決手段】 血管内皮増殖因子 (VEGF) が、破骨細胞の形成、生存を促進する活性を有することを見出した。この活性は、血管内皮増殖因子受容体1型 (VEGFR-1) を介していた。また、M-CSF欠損マウスのVEGFR-1の活性化を阻害することにより、破骨細胞を減少させることに成功した。本発明により、VEGFR-1の活性化を調節する薬剤を用いて破骨細胞の形成や生存を制御し、骨吸収の異常を伴う疾患を治療することが可能となる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 破骨細胞の分化を誘導する方法であって、血管内皮増殖因子受容体1型を発現する細胞を、該血管内皮増殖因子受容体1型を活性化させる化合物の存在下で培養することを特徴とする方法。

【請求項2】 血管内皮増殖因子受容体1型を活性化させる化合物が、血管内皮増殖因子受容体1型に対するリガンドである、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 血管内皮増殖因子受容体1型に対するリガンドが、血管内皮増殖因子または胎盤増殖因子1型である、請求項2に記載の方法。

【請求項4】 血管内皮増殖因子受容体1型を発現する細胞が非接着性骨髄細胞である、請求項1から3のいずれかに記載の方法。

【請求項5】 破骨細胞の分化、生存、および／または骨吸収を促進または阻害する化合物をスクリーニングする方法であって、(a)被験化合物存在下、血管内皮増殖因子受容体1型に血管内皮増殖因子または胎盤増殖因子1型を接触させる工程、(b)該血管内皮増殖因子受容体1型と該血管内皮増殖因子または胎盤増殖因子1型との結合を検出する工程、(c)該結合を促進または阻害する化合物を選択する工程、を含む方法。

【請求項6】 破骨細胞の分化、生存、および／または骨吸収を促進する化合物をスクリーニングする方法であって、(a)血管内皮増殖因子受容体1型を発現する細胞に被験化合物を接触させる工程、(b)破骨細胞の分化、生存、および／または骨吸収を検出する工程、

(c)該分化、生存、および／または骨吸収を促進する化合物を選択する工程、を含む方法。

【請求項7】 破骨細胞の分化、生存、および／または骨吸収を阻害する化合物をスクリーニングする方法であって、(a)被験化合物存在下、血管内皮増殖因子受容体1型を発現する細胞に血管内皮増殖因子または胎盤増殖因子1型を接触させる工程、(b)破骨細胞の分化、生存、および／または骨吸収を検出する工程、(c)該分化、生存、および／または骨吸収を阻害する化合物を選択する工程、を含む方法。

【請求項8】 血管内皮増殖因子受容体1型を発現する細胞が非接着性骨髄細胞である、請求項6または7に記載の方法。

【請求項9】 血管の誘導を促進する化合物をスクリーニングする方法であって、(a)血管内皮増殖因子受容体1型を発現する細胞に被験化合物を接触させる工程、

(b)破骨細胞の分化、生存、および／または骨吸収を検出する工程、(c)該分化、生存、および／または骨吸収を促進する化合物を選択する工程、を含む方法。

【請求項10】 血管の誘導を阻害する化合物をスクリーニングする方法であって、(a)被験化合物存在下、血管内皮増殖因子受容体1型を発現する細胞に血管内皮増殖因子または胎盤増殖因子1型を接触させる工程、

(b)破骨細胞の分化、生存、および／または骨吸収を検出する工程、(c)該分化、生存、および／または骨吸収を阻害する化合物を選択する工程、を含む方法。

【請求項11】 血管内皮増殖因子受容体1型を発現する細胞が非接着性骨髄細胞である、請求項9または10に記載の方法。

【請求項12】 血管内皮増殖因子受容体1型を活性化させる化合物を有効成分とする、破骨細胞の分化、生存、および／または骨吸収を促進するための薬剤。

【請求項13】 血管内皮増殖因子受容体1型を活性化させる化合物が、血管内皮増殖因子受容体1型に対するリガンドである、請求項12に記載の薬剤。

【請求項14】 血管内皮増殖因子受容体1型に対するリガンドが、血管内皮増殖因子または胎盤増殖因子1型である、請求項13に記載の薬剤。

【請求項15】 血管内皮増殖因子受容体1型を活性化させる化合物が、請求項5または6に記載のスクリーニング方法により単離される化合物である、請求項12に記載の薬剤。

【請求項16】 大理石病、低回転型骨粗鬆症、および骨折からなる群より選択される疾患または傷害の治療のために用いられる、請求項12から15のいずれかに記載の薬剤。

【請求項17】 血管内皮増殖因子受容体1型の活性化を阻害する化合物を有効成分とする、破骨細胞の分化、生存、および／または骨吸収を阻害するための薬剤。

【請求項18】 血管内皮増殖因子受容体1型の活性化を阻害する化合物が、血管内皮増殖因子受容体1型と血管内皮増殖因子受容体1型に対するリガンドとの結合を阻害する化合物である、請求項17に記載の薬剤。

【請求項19】 血管内皮増殖因子受容体1型の活性化を阻害する化合物が、血管内皮増殖因子に対する抗体である、請求項17に記載の薬剤。

【請求項20】 血管内皮増殖因子受容体1型の活性化を阻害する化合物が、請求項5または7に記載のスクリーニング方法により単離される化合物である、請求項17に記載の薬剤。

【請求項21】 高回転型骨粗鬆症、骨転移癌、骨肉腫、高カルシウム血症、および慢性関節リウマチにおける骨破壊からなる群より選択される疾患の治療のために用いられる、請求項17から20のいずれかに記載の薬剤。

【請求項22】 請求項9に記載の方法により単離される化合物を有効成分とする、血管誘導促進剤。

【請求項23】 請求項10に記載の方法により単離される化合物を有効成分とする、制癌剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、血管内皮増殖因子受容体1型を標的とした破骨細胞の分化誘導系、該分化

誘導系を利用した破骨細胞の分化、生存、および／または骨吸収を調節する化合物のスクリーニング方法、並びに血管内皮増殖因子受容体1型を標的とした破骨細胞の分化、生存、および／または骨吸収を調節するための薬剤に関する。

【0002】

【従来の技術】第3染色体に存在する骨大理石病の原因遺伝子 (osteopetrosis; *op*) の劣性突然変異は、さまざまな臓器において破骨細胞、単球、およびマクロファージの著しい減少をもたらす (Marks, S.C., Jr., and P.W. Lane. 1976. *J. Hered.* 67:11; Marks, S.C., Jr. 1982. *Am. J. Anat.* 163:157; Wiktor-Jedrzejczak, W. et al. 1982. *J. Exp. Med.* 156:1516)。この減少は、マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) 遺伝子のコード領域に存在する1塩基対の挿入により、機能的なマクロファージコロニー刺激因子 (M-CSFまたはCSF-1) が欠損することが原因であり (Yoshida, H. et al. 1990. *Nature (Lond.)*. 345:442)、組換えヒトM-CSF (rhM-CSF) の投与により補うことができる (Felix, R. et al. 1990. *Endocrinology*. 127:2592; Kodama, H. et al. 1991. *J. Exp. Med.* 173:269; Wiktor-Jedrzejczak, W. et al. 1991. *Exp. Hematol.* 19:1049; Sundquist, K.T. et al. 1995. *Bone*. 16:39)。M-CSFが破骨細胞系列の細胞に直接作用することが、M-CSFの受容体であるc-Fmsを *in vitro* (Kodama, H. et al. 1991. *J. Exp. Med.* 173:1291) および *in vivo* (Hofstetter, W. et al. 1992. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89:9637) で破骨細胞に発現させる実験により実証されている。これらの結果は、M-CSFが生理的な条件下、ある種の臓器において、破骨細胞やマクロファージの分化に本質的な役割を果たしていることを示している。

【0003】しかしながら *op/op*マウスにおいて、骨大理石病の深刻な症状が明確に現われるのは若いときに限られ、次第に破骨細胞が増加すると共に症状は改善されていく (Marks, S.C., Jr., and P.W. Lane. 1976. *J. Hered.* 67:11; Marks, S.C., Jr. 1982. *Am. J. Anat.* 163:157; Beqq, S.K. et al. 1993. *J. Exp. Med.* 177:237)。本発明者らは以前、rhM-CSFを高い用量 (5μg/マウス以上) で投与すると、単回投与でも*op/op*マウスの破骨細胞の形成 (recruitment) を誘導し、破骨細胞を生存させ、長期にわたる能動的骨吸収を維持させることを見出している (Kodama, H. et al. 1993. *J. Bone Miner. Res.* 8:45; Niida, S. et al. 1994. *J. Bone Miner. Res.* 9:873)。このことから、M-CSF欠損下での破骨細胞の骨吸収に関わる他の因子の存在が示唆される。この点に関してはいくつかのデータが報告されているが、議論の余地が残されるものである。例えば、*op/op*マウスの骨大理石病の改善に、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) が効果を持つという報告がある一方、*in vitro*で GM-CSFが破骨細胞の分化に関与

することが示唆されている (MacDonald, B.R. et al. 1986. *J. Bone Miner. Res.* 1:227; Kurihara, N. et al. 1989. *Blood*. 74:1295; Takahashi, N. et al. 1991. *J. Bone Miner. Res.* 6:977)。また、Wiktor-Jedrzejczakら (Wiktor-Jedrzejczak, W. et al. 1994. *Endocrinology*. 134:1932) およびNilssonら (Nilsson, S.K. et al. 1995. *Blood*. 86:66) は、GM-CSFはマクロファージ欠損を改善できるが、骨大理石病は改善できないと報告している。つい最近になりMyintら (Myint, Y.Y. et al. 1999. *Am. J. Pathol.* 154:553) は、GM-CSFおよび／またはインターロイキン3は低用量において*op/op*マウスの破骨細胞の発生を誘導することを報告した。

【0004】c-Fmsは、8種の血小板由来増殖因子受容体 (PDGFR) ファミリーの1つである (Kondo, K. et al. 1998. *Gene*. 208:297)。血管内皮増殖因子 (Vascular Endothelial Growth Factor; VEGF) に特異的な受容体としては、PDGFRに属する2つの受容体型チロシンキナーゼ、VEGFR-1 / Flt-1および VEGFR-2 / KDR / Flk-1と、neuropilin-1とが同定されている (Neufeld, G. et al. 1999. *FASEB J.* 13:9)。すべてのVEGFRを発現する内皮細胞と違い、単球／マクロファージ系列の細胞は主にVEGFR-1を発現する (Neufeld, G. et al. 1999. *FASEB J.* 13:9; Berleon, B. et al. 1996. *Blood*. 87:3336; Clauss, M. et al. 1996. *J. Biol. Chem.* 271:17629)。VEGFR-1はVEGFや胎盤増殖因子1型 (PlGF-1) に対する走化性反応を媒介する (Neufeld, G. et al. 1999. *FASEB J.* 13:9; Berleon, B. et al. 1996. *Blood*. 87:3336; Clauss, M. et al. 1996. *J. Biol. Chem.* 271:17629; Park, J.E. et al. 1994. *J. Biol. Chem.* 169:25646; Sawano, A. et al. 1996. *Cell Growth Differ.* 7:213; Hiratsuka, S. et al. 1998. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95:9349)。PlGF-1はVEGFと高い相同性を有し、臍帯静脈の内皮細胞や胎盤で発現している。このような知見はあるものの、VEGFおよびPlGF-1、並びにそれらの受容体であるVEGFR-1と破骨細胞による骨吸収との関係は知られていなかった。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明らは、血管内皮増殖因子受容体1型を標的とした新規な破骨細胞の分化誘導系、該系を利用した破骨細胞の分化、生存、および／または骨吸収を調節する化合物のスクリーニング方法、並びに血管内皮増殖因子受容体1型を標的とした破骨細胞の分化、生存、および／または骨吸収を調節するための薬剤を提供することを課題とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、マクロファージと破骨細胞は細胞系譜上、親密な関係があることから、マクロファージに対して作用するサイトカインである血管内皮増殖因子 (VEGF) が破骨細胞形成において効果を有するのではないかと考えた。そこで、M-CSF遺

伝子が欠損しており破骨細胞の形成に障害を持つ骨大理石病モデルマウス (op/opマウス) に VEGF を投与する実験を行った。その結果、VEGF は、破骨細胞による骨吸収において、op/opマウスの M-CSF 欠損を完全に相補できることを見出した。

【0007】組換え型ヒト VEGF (rhVEGF) を op/opマウスに1回投与することにより、破骨細胞が形成された。形成された破骨細胞は、主に VEGF 受容体 1 型 (VEGFR-1) を発現していた。VEGF の代わりに組換えヒト胎盤増殖因子 1 型 (rhPIGF-1) を投与することによっても VEGF と同様に破骨細胞が形成されたことから、VEGF のシグナルは VEGFR-1 を介していることが示された。組換え型ヒト M-CSF で誘導した破骨細胞は、VEGFR-1/Fc キメラ蛋白質の投与により VEGF を中和すると死んだが、引き続き組換え型ヒト M-CSF を投与することで生存させることができた。組換え型ヒト M-CSF によって支持された破骨細胞と内因性 VEGF によって支持された破骨細胞とは、骨吸収活性において殆ど差がなかった。op/opマウスは加齢と共に破骨細胞が増加し、骨大理石病が改善されてくる。このマウスに抗 VEGF 抗体を投与したところ、殆どの破骨細胞が消失したことから、op/opマウスの加齢に伴う骨大理石病の改善が内因的に産生される VEGF によるものであり、変異マウスで破骨細胞が生存 (appearance) するには、内因的に産生される VEGF が必要であることが示された。さらに、生体外 (in vitro) での破骨細胞分化の支持を調べた実験でも、VEGF は M-CSF の活性を代替できることが判明した。

【0008】VEGF 投与によって形成された破骨細胞の微細形態を観察したところ、波状縁 (ruffled border) および明帯 (clear zone) が認められ、ゴルジ装置および多数のミトコンドリアが観察されるなど、活発な破骨細胞の特色が示されていた。また、成熟破骨細胞を単離して、in vitro における M-CSF または VEGF による活性効果を調べたところ、VEGF の添加により破骨細胞の伸展現象が観察された。

【0009】以上の結果から、M-CSF と VEGF は破骨細胞による骨吸収において、その機能が重複していることが実証された。どちらかのサイトカインが存在すれば、破骨細胞による骨吸収の全過程、すなわち破骨細胞の分化、破骨細胞の生存、および能動的骨吸収を支持するのに十分である。VEGF は M-CSF とは異なる受容体を介しており、異なるリガンド-受容体の組み合わせを使うユニークなタイプのサイトカインシグナルのリダンダンシーの存在が明らかとなった。

【0010】VEGF や PIGF-1 などの VEGFR-1 のリガンドは VEGFR-1 を活性化し、破骨細胞を分化・形成させ、骨吸収を促進することが明らかとなったことから、VEGFR-1 のリガンドなどの VEGFR-1 を活性化する化合物は、骨吸収活性が低下している骨大理石病を含む疾患の治療薬として用いることが可能となる。逆に、VEGFR-1 の活性化を

抑制する薬剤は、破骨細胞の形成を阻害し、骨吸収を抑制する薬剤として用いることが可能である。このような薬剤は、M-CSF/c-Fms 系のシグナル伝達を抑制する薬剤と併用することでより高い効果を発揮し、破骨細胞の形成を阻害し、骨吸収を抑制すると考えられる。これにより、骨粗鬆症などの予防や治療を行なうことが可能である。

【0011】また、VEGFR-1 の活性化による破骨細胞の分化、生存、および/または骨吸収を指標としたスクリーニング系は、骨吸収を調節するための薬剤のスクリーニング以外にも、VEGFR-1 を介する他の機能を制御する薬剤をスクリーニングするためにも使用することが考えられる。例えば、VEGFR-1 は発生時の脈管形成や成体における血管新生の促進、また血管内皮の透過性亢進に重要な機能を果たしている。従って VEGFR-1 の活性を促進する化合物は、傷害や梗塞などの疾病傷害により失われた血管を新生させるための薬剤として有用である。また、腫瘍細胞においては、VEGF 等の VEGFR-1 リガンドの発現が亢進し、血管新生を誘導すると共に腫瘍を拡大させる。従って、VEGFR-1 の活性化を抑制する薬剤は、血管誘導を抑制するため、制癌剤として有用である。このような血管誘導を促進または抑制する化合物を単離するために、骨細胞の形成や骨吸収を指標とする本発明のスクリーニング系を用いることが可能である。これら以外にも、上記のスクリーニング系は VEGFR-1 を介するさまざまなシグナル伝達を調節する化合物を得るために適用することができる。すなわち、破骨細胞の分化、生存、および/または骨吸収を促進または抑制する化合物をスクリーニングする本発明の方法は、VEGFR-1 を介するシグナル伝達を促進または抑制するための化合物を単離するために有用である。VEGFR-1 は内皮細胞の増殖応答のシグナルを媒介するなど、生体内の様々な組織において細胞機能を制御していることが知られており、本発明のスクリーニング方法により単離され得る化合物は、VEGFR-1 を介するこれらの機能を制御するために有用である。

【0012】本発明は、VEGFR-1 を介するシグナルによる破骨細胞の分化誘導系、該分化誘導系を利用した破骨細胞の分化や骨吸収を調節する化合物のスクリーニング、および VEGFR-1 を標的とした破骨細胞の分化や骨吸収を調節するための薬剤に関し、より具体的には、

(1) 破骨細胞の分化を誘導する方法であって、血管内皮増殖因子受容体 1 型を発現する細胞を、該血管内皮増殖因子受容体 1 型を活性化させる化合物の存在下で培養することを特徴とする方法、(2) 血管内皮増殖因子受容体 1 型を活性化させる化合物が、血管内皮増殖因子受容体 1 型に対するリガンドである、(1) に記載の方法、(3) 血管内皮増殖因子受容体 1 型に対するリガンドが、血管内皮増殖因子または胎盤増殖因子 1 型である、(2) に記載の方法、(4) 血管内皮増殖因子受容

体1型を発現する細胞が非接着性骨髄細胞である、

(1)から(3)のいずれかに記載の方法、(5)破骨細胞の分化、生存、および/または骨吸収を促進または阻害する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a)被験化合物存在下、血管内皮増殖因子受容体1型に血管内皮増殖因子または胎盤増殖因子1型を接触させる工程、(b)該血管内皮増殖因子受容体1型と該血管内皮増殖因子または胎盤増殖因子1型との結合を検出する工程、(c)該結合を促進または阻害する化合物を選択する工程、を含む方法、(6)破骨細胞の分化、生

存、および/または骨吸収を促進する化合物をスクリーニングする方法であって、(a)血管内皮増殖因子受容体1型を発現する細胞に被験化合物を接触させる工程、

(b)破骨細胞の分化、生存、および/または骨吸収を検出する工程、(c)該分化、生存、および/または骨吸収を促進する化合物を選択する工程、を含む方法、

(7)破骨細胞の分化、生存、および/または骨吸収を阻害する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a)被験化合物存在下、血管内皮増殖因子受容体1型を発現する細胞に血管内皮増殖因子または胎盤増殖因子1型を接触させる工程、(b)破骨細胞の分化、生存、および/または骨吸収を検出する工程、(c)該分化、生存、および/または骨吸収を阻害する化合物を選択する工程、を含む方法、(8)血管内皮増殖因子受容体1型を発現する細胞が非接着性骨髄細胞である、(6)または(7)に記載の方法、(9)血管の誘導を促進する化合物をスクリーニングする方法であって、(a)血管

内皮増殖因子受容体1型を発現する細胞に被験化合物を接触させる工程、(b)破骨細胞の分化、生存、および/または骨吸収を検出する工程、(c)該分化、生存、および/または骨吸収を促進する化合物を選択する工程、を含む方法、(10)血管の誘導を阻害する化合物をスクリーニングする方法であって、(a)被験化合物存在下、血管内皮増殖因子受容体1型を発現する細胞に血管内皮増殖因子または胎盤増殖因子1型を接触させる工程、(b)破骨細胞の分化、生存、および/または骨吸収を検出する工程、(c)該分化、生存、および/または骨吸収を阻害する化合物を選択する工程、を含む方法、(11)血管内皮増殖因子受容体1型を発現する細胞が非接着性骨髄細胞である、(9)または(10)に記載の方法、(12)血管内皮増殖因子受容体1型を活性化させる化合物を有効成分とする、破骨細胞の分化、生存、および/または骨吸収を促進するための薬剤、

(13)血管内皮増殖因子受容体1型を活性化させる化合物が、血管内皮増殖因子受容体1型に対するリガンドである、(12)に記載の薬剤、(14)血管内皮増殖因子受容体1型に対するリガンドが、血管内皮増殖因子または胎盤増殖因子1型である、(13)に記載の薬剤、(15)血管内皮増殖因子受容体1型を活性化させる化合物が、(5)または(6)に記載のスクリーニ

ング方法により単離される化合物である、(12)に記載の薬剤、(16)大理石病、低回転型骨粗鬆症、および骨折からなる群より選択される疾患または傷害の治療のために用いられる、(12)から(15)のいずれかに記載の薬剤、(17)血管内皮増殖因子受容体1型の活性化を阻害する化合物を有効成分とする、破骨細胞の分化、生存、および/または骨吸収を阻害するための薬剤、(18)血管内皮増殖因子受容体1型の活性化を阻害する化合物が、血管内皮増殖因子受容体1型と血管内皮増殖因子受容体1型に対するリガンドとの結合を阻害する化合物である、(17)に記載の薬剤、(19)血管内皮増殖因子受容体1型の活性化を阻害する化合物が、血管内皮増殖因子に対する抗体である、(17)に記載の薬剤、(20)血管内皮増殖因子受容体1型の活性化を阻害する化合物が、(5)または(7)に記載のスクリーニング方法により単離される化合物である、

(17)に記載の薬剤、(21)高回転型骨粗鬆症、骨転移癌、骨肉腫、高カルシウム血症、および慢性関節リウマチにおける骨破壊からなる群より選択される疾患の治療のために用いられる、(17)から(20)のいずれかに記載の薬剤、(22)(9)に記載の方法により単離される化合物を有効成分とする、血管誘導促進剤、(23)(10)に記載の方法により単離される化合物を有効成分とする、制癌剤、に関する。

【0013】

【発明の実施の形態】1.破骨細胞の分化を誘導する方法

本発明者らは、血管内皮増殖因子(VEGF)または胎盤増殖因子1型(PiGF-1)を利用して血管内皮増殖因子受容体1型(VEGFR-1)を活性化させることにより破骨細胞を分化させ、骨吸収を促進させることができることを見出した。従って、本発明は、VEGFR-1を標的として、これを活性化させることにより、該受容体が発現する細胞の破骨細胞への分化を誘導する方法を提供する。本発明の方法は、血管内皮増殖因子受容体1型(VEGFR-1)を発現する細胞に該血管内皮増殖因子受容体1型を活性化させる化合物を接触させることを特徴とする。すなわち、血管内皮増殖因子受容体1型を発現する細胞を、該血管内皮増殖因子受容体1型を活性化させる化合物の存在下で培養することにより実施することができる。培養は、例えば in vitro または in vivo で行うことができる。

【0014】本発明の方法に用いる血管内皮増殖因子受容体1型を活性化させる化合物としては、血管内皮増殖因子受容体1型を活性化させる能力を有する限り特に制限はないが、例えば、血管内皮増殖因子受容体1型に対するリガンドが好適である。血管内皮増殖因子受容体1型に対するリガンドとしては、血管内皮増殖因子(VEGF)、および胎盤増殖因子1型(PiGF-1)が挙げられ、これらリガンドは本発明の方法に特に好適に用いること

ができる。また、これらの蛋白質の受容体結合部を含む断片、合成ペプチド、または合成化合物等であってもよい。

【0015】血管内皮増殖因子受容体1型を発現する細胞としては、血管内皮増殖因子受容体1型を発現し、破骨細胞へ分化しうる細胞であれば特に制限はなく、例えば、非接着性骨髄細胞、脾臓細胞等が挙げられる。また、実施例7に示すように、既に破骨細胞に分化した細胞を、本発明の方法により活性化することもできる。細胞の培養は公知の方法に従って行えばよい。in vitro

における培養は、例えば該化合物を含む培養液で細胞を培養することによって行えばよく、例えば非接着性骨髄細胞であれば実施例4に記載の方法により、また破骨細胞であれば例えば実施例7に記載の方法により行うことができる。

【0016】本発明の方法は in vivo において実施することもできる。in vivo における培養は、例えば該化合物を生体内へ投与することによって行うことができる。すなわち、血管内皮増殖因子受容体1型を活性化させる化合物を生体に投与することにより、生体内で破骨細胞を分化・形成させることが可能である。あるいは、VEGFまたはPlGF-1などの血管内皮増殖因子受容体1型に対するリガンドを発現するベクターを投与することにより体内でリガンドを発現させてもよい。投与は全身投与でも局所投与でもよい。また、生体への投与は ex vivo により行うこともできる。すなわち、生体から骨髄細胞または脾臓細胞などの細胞を取りだし、血管内皮増殖因子受容体1型を活性化させる化合物で処理したり、あるいはVEGFやPlGF-1などの血管内皮増殖因子受容体1型に対するリガンドを発現するベクターを導入し、この細胞を体内に戻すことで、破骨細胞の形成を促進することができる。ex vivoで血管内皮増殖因子受容体1型に対するリガンドの遺伝子を導入する場合は、発現産物が破骨細胞に分化し得る細胞に到達し得る限り、該細胞以外の細胞に遺伝子を導することもできる。本発明の方法は、破骨細胞の形成を促進する既知の化合物と組み合わせて適用することもできる。このような化合物としては、例えばM-CSF/CSF-1などが挙げられる。

【0017】2. 破骨細胞の分化の促進剤または阻害剤のスクリーニング方法

本発明は、また、血管内皮増殖因子受容体1型(VEGFR-1)を標的とした、破骨細胞の分化、生存、および/または骨吸収を促進または阻害する化合物のスクリーニング方法を提供する。本発明のスクリーニング方法の一つの態様としては、血管内皮増殖因子受容体1型とそのリガンドとの結合を指標にした手法が挙げられる。このスクリーニングは、(a)被験化合物存在下、血管内皮増殖因子受容体1型に血管内皮増殖因子または胎盤増殖因子1型を接触させる工程、(b)該血管内皮増殖因子受容体1型と該血管内皮増殖因子または胎盤増殖因子1型

との結合を検出する工程、および、(c)該結合を促進または阻害する化合物を選択する工程、を含む方法により実施することができる。

【0018】具体的には、例えば、精製した血管内皮増殖因子受容体1型(VEGFR-1)をBIAcore(Pharmacia Biotech社製)の金薄膜に結合させておき、精製したリガンド(VEGFまたはPlGF-1など)と被験化合物を混合して薄膜に流し込み、レスポンスを測定する。スクリーニングに用いる被験化合物としては、これらに制限されないが、例えば、細胞抽出液、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成低分子化合物、合成ペプチド、修飾ペプチド、天然化合物などが挙げられる。スクリーニングに用いる被験化合物は、必要に応じて適宜標識して用いられる。標識としては、例えば、放射標識、蛍光標識などが挙げられるが、これらに制限されない。対照として被験化合物非存在下でも同様に測定する。具体的な操作は公知の文献に従えばよい(大野茂男・西村善文 監修, 細胞工学 別冊 実験プロトコルシリーズ, タンパク実験プロトコル 1機能解析編, 第10章, pp. 164-179, 秀潤社)。このスクリーニングにより、VEGFR-1と該血管内皮増殖因子または胎盤増殖因子1型との結合を促進または抑制する化合物を得ることができる。また、RIAとしてVEGFR-1とラベルした精製リガンドおよび被験化合物を同一溶媒にて競争結合させ、その後抗VEGFR-1抗体で沈殿させ、その放射活性等を測定することによりスクリーニングすることも可能である。これにより、例えばVEGFR-1に結合し、VEGFR-1の活性化を抑制する化合物(VEGFR-1のアンタゴニスト)を単離することもできる。

【0019】本発明のスクリーニング方法の他の態様は、上記本発明の破骨細胞の分化誘導系を利用する方法である。該分化誘導系を利用した破骨細胞の分化を促進する化合物のスクリーニング方法は、(a)血管内皮増殖因子受容体1型を発現する細胞に被験化合物を接触させる工程、(b)破骨細胞の分化を検出する工程、および、(c)該分化を促進する化合物を選択する工程、を含む方法により実施することができる。

【0020】スクリーニングに用いる被験化合物としては、これらに制限されないが、例えば、細胞抽出液、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成低分子化合物、合成ペプチド、修飾ペプチド、天然化合物などが挙げられる。また被験化合物として遺伝子を用いる場合には、その遺伝子を細胞に導入して発現させる。スクリーニングに用いる細胞としては、血管内皮増殖因子受容体1型を発現し、破骨細胞へ分化しうる細胞であれば特に制限はなく、例えば、非接着性骨髄細胞、脾臓細胞等が挙げられる。

【0021】具体的には、例えば、マウス骨髄細胞培養系に被験化合物を添加し、7~10日間培養した後、生成する破骨細胞数を測定する。被験化合物の添加により破骨細胞数が有意に増加するような化合物を選択する。被

験化合物を添加する際に、VEGFおよび/またはPIGF-1を共存させておき、形成される破骨細胞数をより増加させる化合物を選択してもよい。

【0022】上記のスクリーニングにより得られる化合物としては、種々の作用点を有するものが考えられる。例えば、血管内皮増殖因子受容体1型に直接作用してその機能を促進するもの、血管内皮増殖因子受容体1型に結合する分子に作用して間接的に該受容体の機能を促進するものなどが含まれる。化合物の作用点は様々な対照実験により検証することができる。例えば、血管内皮増殖因子受容体1型遺伝子の形質転換により該受容体を過剰発現する細胞と対照細胞に被験化合物を接触させ、対照細胞に比べ過剰発現細胞で破骨細胞の分化を有意に促進するかを検証することにより、この化合物が血管内皮増殖因子受容体1型の活性を促進しているかを判断することができる。また、実施例に記載のVEGFR-1/Fcキメラ蛋白質や可溶性VEGFR-1などの、血管内皮増殖因子受容体1型の細胞外ドメイン（またはリガンド結合ドメイン）を含む蛋白質の存在下で破骨細胞の分化の検出を同様に行い、この対照実験と比べ有意に破骨細胞への分化を促進する活性が高い化合物を選択すれば、血管内皮増殖因子受容体1型のリガンドとして作用する化合物を得ることができる。または、血管内皮増殖因子受容体1型遺伝子を欠損する細胞やキナーゼ活性を欠損する変異体を発現する細胞などを対照として同様の検出を行い、化合物の効果が抑制されるかを確認することもできる。このようにして、ある化合物が血管内皮増殖因子受容体1型を介する破骨細胞の分化を促進するかを判定することが可能である。また、スクリーニングを、M-CSFの受容体であるc-Fmsに対する抗体の存在下で行うか、あるいはc-Fmsを変異させた細胞を用いて行い、M-CSF/c-Fmsを介するシグナルを遮断しておくこともできる。

【0023】上記本発明の破骨細胞の分化誘導系を利用して破骨細胞の分化を阻害する化合物のスクリーニングを行なうことも可能である。このスクリーニングは、

(a) 被験化合物存在下、血管内皮増殖因子受容体1型を発現する細胞に血管内皮増殖因子または胎盤増殖因子1型を接触させる工程、(b) 破骨細胞の形成、生存、および/または骨吸収を検出する工程、および、(c) 該形成、生存、および/または骨吸収を阻害する化合物を選択する工程、を含む方法により実施することが可能である。

【0024】具体的には、例えば、VEGFまたはPIGF-1の存在下、マウス骨髓細胞培養系に被験化合物を添加し、7~10日間培養した後、生成する破骨細胞数を測定する。添加により破骨細胞数が有意に減少するような化合物を選択する。

【0025】本発明のスクリーニングにおける、骨髓細胞の調製や破骨細胞の形成および/または生存の測定は、例えば以下のようにして行なうことができる。

＜マウス骨髓細胞の調製＞6~12週令のマウス（C3H/He J；日本クレア）の大腿骨及び脛骨を無菌的に取り出し、その骨端を切り落とし、両端から1回ずつ26Gの針を付けたシリンジで1mlの α -MEM培地（10%胎児血清、100単位/mlペニシリンG、100 μ g/mlストレプトマイシンを含む）で骨髓細胞を押し出し、良くビベティングした後骨残渣が沈殿するまで待ち、その上清を回収する。それを更に新鮮な培地で1~2回洗い、アッセイ用の骨髓細胞を調製する。

10 ＜破骨細胞分化形成法＞上記の骨髓細胞を 10^5 Mの活性型ビタミンD₃〔1,25(OH)₂D₃〕を含む α -MEM培地中にけん濁させ、 2×10^5 個細胞/mlの濃度に調製し、96穴プレートに180 μ lと、被験試料溶液を20 μ l加え、37°C、5%CO₂下、1または2週間培養する。その間、3~4日間隔で培地の3/4を新しい培地と交換し、新たに被験試料溶液を同量添加する。

20 ＜破骨細胞の同定法＞破骨細胞のマーカー酵素であるTRAP（酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ）を基質で染色する。即ち上記の培養骨髓細胞をアセトン-クエン酸緩衝液で固定した後、酒石酸存在下で基質（Naphthol AS-MXphosphate）と色素（Fastredviolet LB salt）を37°Cで1時間反応させることにより染色する（Takahashi, N. et al., Endocrinology, 122, p1373 (1988)）。

30 【0026】また、骨吸収の測定は、象牙を用いたpit形成法を用いて、例えば以下のように行うことができる。象牙より直径6mm、1mm厚の象牙質スライスを作製し、それを80%アルコール中で超音波処理することにより滅菌する。 α -MEM培地で洗浄した後、各スライスを96ウェルプレートのウェル底に移し、その上で上記「破骨細胞分化形成法」の方法に従って骨髓細胞から破骨細胞を分化誘導する。1または2週間後、象牙質スライス上の破骨細胞を上記TRAP染色法にて染色し、0.25%トリプシン-0.02%EDTAで一晩処理し、スライス上の細胞をシリコンスクレイパーで削り取る。象牙質スライス上のpit（吸収窩）を顕微鏡下で観察し、その数またはpitあたりのメッシュ数を測定することにより骨髓細胞より分化誘導された細胞の骨吸収活性（骨分解活性）を調べることができる。

40 【0027】上記本発明のスクリーニング系は、破骨細胞の分化誘導を行う薬剤のスクリーニングに限定されず、血管内皮増殖因子受容体1型を介する様々なシグナル伝達を促進または抑制する化合物を単離するために有用である。例えば、本発明のスクリーニング系を、血管誘導を促進または抑制する薬剤のスクリーニングに用いることが可能である。血管内皮増殖因子受容体1型は血管新生に関与しているため、この活性を調節する化合物は血管誘導を制御するための薬剤として利用することができる。血管誘導活性を直接アッセイすることは煩雑であるので、本発明の破骨細胞誘導系を用いることで、より簡便にスクリーニングを行うことができる。実際のス

クリーニングは、上記に述べた破骨細胞の形成、生存、および／または骨吸収を促進または阻害する化合物のスクリーニングと同様に行えばよい。このスクリーニングにより得られる血管誘導促進剤は、例えば心筋梗塞や脳梗塞などの疾病により失われた血管を再生させるための薬剤として有用である。逆に血管誘導抑制剤は制癌剤として有用である。対象となる癌としては、すべての固形腫瘍が挙げられる。

【0028】3. 破骨細胞の分化の促進剤または阻害剤 (1) 促進剤

本発明において、血管内皮増殖因子(VEGF)をop/opマウスに投与することにより、破骨細胞が形成され、また、VEGFの代わりに胎盤増殖因子1型(PIGF-1)を投与することによってもVEGFと同様に破骨細胞が形成された。すなわち、VEGFのシグナルは血管内皮増殖因子受容体1型を介していることが示された。この事実、血管内皮増殖因子受容体1型を標的とする化合物が、破骨細胞の形成・生存、さらには骨吸収を調節する薬剤となることを示している。

【0029】すなわち本発明は、血管内皮増殖因子受容体1型を活性化させる化合物を有効成分とする、破骨細胞の形成、生存、および／または骨吸収を促進するための薬剤に関する。薬剤の有効成分となる血管内皮増殖因子受容体1型を活性化させる化合物には、例えば、血管内皮増殖因子受容体1型に結合し活性化するもの(受容体のアゴニスト)の他、血管内皮増殖因子受容体1型とそのリガンドとの結合を促進する化合物などが含まれる。好適な化合物としては、例えば、血管内皮増殖因子受容体1型に対するリガンドが挙げられる。血管内皮増殖因子受容体1型のリガンドとしては、血管内皮増殖因子(VEGF)および胎盤増殖因子1型(PIGF-1)が知られている。また、上記のスクリーニングにより得られる化合物を用いてもよい。このような化合物は、in vivo、ex vivo、またはin vitroで、破骨細胞の形成を誘導し、また、その生存を維持するための薬剤として用いられる。また、生体に投与して骨吸収の促進のために用いることもできる。血管内皮増殖因子(VEGF)や胎盤増殖因子1型(PIGF-1)などのタンパク質を投与する場合には、これら蛋白質を直接または ex vivo で投与する以外に、これらの蛋白質をコードする核酸を用いた遺伝子治療なども考えられる。治療の対象となる疾患としては、骨大理石病や低回転型骨粗鬆症などが挙げられ、また、骨折治癒促進のために使用することも可能である。

【0030】(2) 阻害剤

また、本発明は血管内皮増殖因子受容体1型の活性化を阻害する化合物を有効成分とする、破骨細胞の形成、生存、および／または骨吸収を阻害するための薬剤に関する。このような化合物には、例えば、血管内皮増殖因子受容体1型に結合してその活性化を阻害するもの(受容体のアンタゴニスト)や血管内皮増殖因子受容体1型と

そのリガンドとの結合を阻害するものなどが含まれる。実施例に示したように、血管内皮増殖因子受容体1型のリガンドに対する抗体の投与は、該リガンドと血管内皮増殖因子受容体1型との結合を阻害し、破骨細胞数を減少させた(実施例5)。このように、血管内皮増殖因子受容体1型またはそのリガンドに対する抗体は、破骨細胞の形成、生存、および／または骨吸収を阻害するための本発明の薬剤として有用である。抗体治療に用いる場合は、ヒト型抗体もしくはヒト抗体であることが好ましい。また、血管内皮増殖因子受容体1型とFcとのキメラ蛋白質など、可溶性に改変した血管内皮増殖因子受容体1型蛋白質の投与は、リガンドを中和する効果を示す(実施例3)。可溶性の受容体は天然にも存在する。このような蛋白質も本発明の薬剤に好適に用いられる。また、上記のスクリーニングにより得られる化合物を用いてもよい。

【0031】このような化合物は、in vivo、ex vivo、またはin vitroで、破骨細胞の形成および／または生存を抑制するための薬剤として用いられ、また、生体に投与すれば骨吸収を抑制することができる。治療の対象となる疾患としては、骨転移癌、骨肉腫、高回転型骨粗鬆症、高カルシウム血症、慢性関節リウマチにおける骨破壊などが挙げられる。

【0032】(3) 製剤化

破骨細胞の分化、生存、および／または骨吸収を調節する化合物や血管誘導を調節する化合物は、in vitro または in vivo 等における骨吸収の調節剤(促進剤または抑制剤)、または血管誘導の調節剤(促進剤または抑制剤)などの薬剤として有用である。本発明の薬剤は試験研究等における試薬として、また各種疾患の予防または治療のための医薬として利用され得る。本発明の薬剤は、他の溶質または溶媒と共に組成物とすることもできる。破骨細胞の分化、生存、および／または骨吸収を調節する化合物や血管誘導を調節する化合物等を医薬として用いる場合には、化合物自体を直接患者に投与する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化して投与を行うことも可能である。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤などと適宜組み合わせ製剤化して投与することが考えられる。患者への投与は、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射などのほか、鼻腔内の、経気管支的、皮肉の、筋内の、または経口的に当業者に公知の方法により行いうる。インビボ法により投与する場合は、一般的には注射剤等とされ、必要に応じて慣用の担体を加えてもよい。また、リボソームまたは膜融合リボソーム(センダイウイルス(HVJ)-リボソーム等)の形態にした場合は、懸濁剤、凍結剤、遠心分離濃縮凍結剤等のリボソーム製剤とすることができる。投与量は、治療の目的、患者の体重や年齢、投与方法などにより変動するが、当業者で

あれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。また、該化合物がDNAによりコードされるものであれば、該DNAを遺伝子治療用ベクターに組み込み、遺伝子治療を行うことも考えられる。投与量、投与方法は、患者の体重や年齢、症状、有効成分の活性などの諸要因により変動するが、当業者であれば適宜選択することが可能である。投与量は、通常は0.0001~100mq、好ましくは0.001~10mqの範囲内であると考えられる。

【0033】

【実施例】以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

【実施例1】破骨細胞形成に及ぼすVEGFの効果

M-CSF/CSF-1の活性を喪失したosteopetrotic (op/op)マウスにおいて、機能的M-CSFの欠損をVEGFが相補し、破骨細胞の形成を支持することができるかを調べるため、まず、rhM-CSF、rhVEGF165、rhVEGF121、またはrhPIGF-1を12日齢のop/opマウスへ投与する実験を行った。op/opマウスとその同腹正常個体(+/?)は以前記載したように作製した(Kodama, H. et al. 1991. J. Exp. Med. 173:269; Kodama, H. et al. 1993. J. Bone Miner. Res. 8:45)。マウスがop/op遺伝型であるかは、11日齢で切歯萌出がないことにより同定した。サイトカインおよび/または抗体のop/opマウスへの投与を以下に行った。5μgのrhM-CSF (Austral Biologicals, San Ramon, CA)、rhVEGF165 (Genzyme, Cambridge, MA)、rhVEGF121 (Genzyme)、またはrhPIGF-1 (R&D Systems, Minneapolis, MN)は、12日齢のop/opマウスに腹腔内投与し、投与後3日目に屠殺した。AFS98ラット抗マウスc-Fmsモノクローナル抗体(Sudo, T. et al. 1995. Oncogene. 11:2469)を投与する場合は、サイトカイン投与の2時間前、およびサイトカイン投与の24時間後の2回、変異マウスの腹腔内へ750μg/マウスの用量で投与し、サイトカイン投与後3日に屠殺した。屠殺から破骨細胞の計数までは以下のように行った。op/opマウスをエーテルで麻酔し、4%ペリオデート-リジン-バラホルムアルデヒド固定液(pH7.4)を下行大動脈から灌流させた。大腿骨は10% EDTA (pH7.0)中で10日間脱カルシウムを行い、パラフィンに包埋した。大腿骨全体を含む試料の中央部の縦断切片(7mm厚)を作製し、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ(TRAP)活性による染色を以前記載したように行い(Kodama, H. et al. 1993. J. Bone Miner. Res. 8:45; Niida, S. et al. 1994. J. Bone Miner. Res. 9:873)、ヘマトキシリンでカウンター染色を行った。2個以上の核を持つTRAP陽性細胞を破骨細胞として計数した。3個体のマウスから得た6切片を計数し、平均±標準偏差を求めた。いくつかの切片はマロリー(Mallory)のアザン染色を行った。

【0034】表1に示すように、上記の因子のいずれか5μgの1回の投与は、変異マウスにおける破骨細胞の

形成には十分であったが、rhVEGF (rhVEGF165およびrhVEGF121)やrhPIGF-1による形成はrhM-CSFによるものに比べ60~70%であった。アンタゴニストとして作用する抗c-Fmsモノクローナル抗体、AFS98 (Sudo, T. et al. 1995. Oncogene. 11:2469)は、rhM-CSFによる破骨細胞の形成を約25%にまで減少させたが、rhVEGFやrhPIGF-1による形成は減少させなかった。このことから、c-Fmsは、破骨細胞前駆細胞のM-CSFへの応答を媒介しているが、VEGFやPIGF-1への応答は媒介していないことが確認された。

【0035】

【表1】op/opマウスにおけるrhM-CSF、rhVEGF、およびrhPIGF-1の破骨細胞形成能

サイトカイン	AFS98	破骨細胞/切片 (平均±S.D.)
なし	-	3±2
rhM-CSF	-	60±6
rhM-CSF	+	14±9
rhVEGF165	-	42±1
rhVEGF165	+	43±7
rhVEGF121	-	37±4
rhPIGF-1	-	37±2
rhPIGF-1	+	35±2

【0036】【実施例2】VEGFRの免疫組織化学染色

2~3週齢の+/?マウスまたはop/opマウス的大腿骨を実施例1と同様にして固定し、パラフィンで包埋した。大腿骨の切片(5mm厚)をウサギ抗マウスVEGFR-1ポリクローナル抗体(Santa Cruz Biotechnology)またはAVAS12ラット抗マウスVEGFR-2モノクローナル抗体(Kataoka, H. et al. 1997. Develop. Growth Differ. 39:729)で免疫組織化学染色を行った。Vectastain elite ABC キット(Vector Laboratories, Burlingame, CA)を用い、ヘマトキシリンでカウンター染色を行った。正常ウサギIgG (Santa Cruz Biotechnology)およびラットIgG 2a (Santa Cruz Biotechnology)をそれぞれポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の対照として用いた。

【0037】図1Aに示したように、破骨細胞はウサギ抗マウスVEGFR-1ポリクローナル抗体により強く染色されたが、内皮細胞はVEGFR-1に弱く陽性であった。一方、破骨細胞はAVAS12抗マウスVEGFR-2モノクローナル抗体(Kataoka, H. et al. 1997. Develop. Growth Differ. 39:729)では染色されなかったが、内皮細胞はVEGFR-2染色に関して陽性であった(図1B)。正常ウサギIgG (図1C)およびラットIgG 2aではどちらの細胞種も染色されなかった。rhM-CSFで誘導されたop/opマウスの破骨細胞も上記と同様の染色パターンを示した。これらの

結果から、破骨細胞は、単球／マクロファージ系列の細胞と同様、主にVEGFR-1を発現していることが実証された (Berleon, B. et al. 1996. Blood. 87:3336; Claus, M. et al. 1996. J. Biol. Chem. 271:17629)。VEGF 121は neuropilin-1とは結合しない (Neufeld, G. et al. 1999. FASEB J. 13:9)。PlGF-1はVEGFR-1に結合するが、VEGFR-2やneuropilin-1とは結合しない (Neufeld, G. et al. 1999. FASEB J. 13:9; Berleon, B. et al. 1996. Blood. 87:3336; Claus, M. et al. 1996. J. Biol. Chem. 271:17629; Park, J.E. et al. 1994. J. Biol. Chem. 269:25646; Savano, A. et al. 1996. Cell Growth Differ. 7:213)。破骨細胞形成の支持に関して、rhVEGF121およびrhPlGF-1が共にrhVEGF165と同等の活性を示した (表1) ことから、破骨細胞の前駆細胞のVEGFに対する応答がVEGFR-1を介していることが確かめられた。

【0038】[実施例3] 破骨細胞の形成および生存におけるVEGFの中和の影響

次に本発明者らは、op/opマウスにVEGFR-1/Fcキメラ蛋白質を投与することによって、内因的に産生されるVEGFを中和し、VEGFおよびM-CSFが成熟破骨細胞の生存を支持する能力に関して調べた。まず12日齢op/opマウスにrhM-CSFを1回投与する前処理を行った。この前処理の4日後から、5μgのVEGFR-1/Fcキメラ蛋白質 (R&D Systems) および/またはrhM-CSFを12時間おきに6回、腹腔内投与した。前処理後7日のマウスを屠殺した。キメラ蛋白質の対照として、5μgのヒトIgG (ICN Pharmaceuticals, Aurora, OH) を上記と同様に投与した。大腿骨全体の中央部の縦断切片における破骨細胞数を計数した。結果は、3個体のマウスから得た6切片の平均±標準偏差で表した (表2)。

【0039】本発明者らが以前報告 (Kodama, H. et al. 1993. J. Bone Miner. Res. 8:45; Niida, S. et al. 1994. J. Bone Miner. Res. 9:873) したように、rhM-CSFを1回投与後、3日で破骨細胞数はプラトーに達し、7日目まで維持された (表1および2)。4～6日目に12時間おきにキメラ蛋白質を連続的に投与すると、破骨細胞は約25%に減少した。ヒトIgGの投与では破骨細胞数の変化は起こらなかった (表2)。それに対して、rhM-CSFをVEGFR-1/Fcと共に投与したところ、破骨細胞数はrhM-CSFのみを連続して投与したときと同様のレベルまで増加した。これらの結果は、rhM-CSFの単回投与後に形成される破骨細胞は、op/opマウスで内因的に産生されるVEGFにより支持されていることを示すと共に、M-CSFは成熟破骨細胞の生存をVEGFの助けなしに支持できることを示している。

【0040】

【表2】 rhM-CSFで形成したop/opマウスの破骨細胞の生存に及ぼすVEGFR-1/Fcキメラ蛋白質投与の効果

処理	破骨細胞/切片 (平均±S.D.)
なし	59±9
VEGFR-1/Fc	15±5
ヒトIgG1	65±9
VEGFR-1/FcおよびrhM-CSF	87±9
rhM-CSF	81±8

【0041】本発明者らはさらに、1回のrhM-CSF投与のみを受けたop/opマウス、または1回のrhM-CSF投与に加え、VEGFR-1/FcおよびrhM-CSFの連続投与を受けたop/opマウスの大腿骨の骨吸収を調べた。前者の群のマウスの破骨細胞は内因性のVEGFの支持を受けて機能することができ、後者の群は外来性のrhM-CSFに頼ることになる。

【0042】以前の報告通り (Kodama, H. et al. 1993. J. Bone Miner. Res. 8:45)、rhM-CSFを1回投与後7日目には、大腿骨において大量の骨小柱 (bone trabeculae) の吸収と骨髄への置換が認められた (図2Aおよび2B)。後者の群のマウスにおいても、同様に骨吸収が観察された (図2C)。これらの観察から、M-CSFおよびVEGFは共に、破骨細胞の骨吸収を支持できることが示された。

【0043】上記のように、成熟破骨細胞の生存とそれらの機能発現に十分な量の内因性VEGFが産生されていることが判明した。そこで次に、rhM-CSFは内因性VEGFの助けなしに破骨細胞を形成できるのかを調べた。12日齢からop/opマウスの処理を開始した。前処理なしで5μgのrhM-CSFを単独で1回投与、あるいは5μgのrhM-CSFを単独、または5μgのVEGFR-1/Fcと共に12時間おきに6回連続的に投与し、処理開始から3日後にマウスを屠殺した。大腿骨全体の中央部の縦断切片における破骨細胞数を計数した。結果は、3個体のマウスから得た6切片の平均±標準偏差で表した。表3に示すように、rhM-CSFを1回投与したときに比べ、複数回投与すると2倍の数の破骨細胞が形成された。rhM-CSFと同時にVEGFR-1/Fcを投与しても、破骨細胞形成に影響を与えなかった。これらの結果は、M-CSFが in vivo で破骨細胞の分化を支持する能力を持つことを初めて明確に実証するものである。

【0044】

【表3】 rhM-CSFによるop/opマウスの破骨細胞形成に及ぼすVEGFR-1/Fcキメラ蛋白質投与の効果

処理	投与回数	破骨細胞/切片 (平均±S.D.)
なし	0	3±2
rhM-CSF	1	56±9
rhM-CSF	6	108±11
rhM-CSFおよびVEGFR-1/Fc	6	101±7

【0045】[実施例4] インビトロ培養系におけるVEGFによる破骨細胞の生成

M-CSFは破骨細胞の分化を ODF / OPGL / TRANCE / RANK L (osteoclast differentiation factor / osteoprotegerin ligand / TNF-related activation-induced cytokine / receptor activator of nuclear factor κ B ligand) と共同して支持することが明らかとなっている (Yasuda, H et al. 1998. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95:3597; Lacey, D.L. et al. 1998. Cell. 93:165)。そこで、rhVEGF165が、破骨細胞の生成において rhM-CSF を代替できるかを、非付着性骨髄細胞の in vitro 培養系を用いて調べた。rhVEGF165および rhM-CSF をウシ胎仔血清 (FBS) にそれぞれ $2 \mu\text{g/ml}$ および 200 ng/ml の濃度に溶かした。96ウェルプレートの各ウェルを $5 \mu\text{l}$ のいずれかのサイトカイン溶液または FBS でコートし、30分間風乾した。5~8週齢の雄 ddY マウス (埼玉実験動物供給所株式会社 (埼玉県北葛飾郡杉戸町) より入手) の脛骨および大腿骨から得た骨髄細胞を、Ly および Mishell (Ly, I.A. and R.I. Mishell. 1974. J. Immunol. Methods. 5:239) の記載に従ってセファデックス G-10 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) カラムに通した。非付着細胞を 1×10^5 cell/well の密度となるようサイトカインでコートしたウェルに播き、 100 ng/ml の組換えヒト RANK リガンド (rhRANKL, PeproTec, London, UK) の存在下または非存在下、15% の FBS を含む α -MEM で7日間培養した。rhVEGF165 および rhM-CSF の最終濃度はそれぞれ 100 ng/ml および 10 ng/ml とした。培養細胞は上記4%パラホルムアルデヒドで固定し、上記に通り TRAP で染色した。また、直径5mmの象牙質のスライス上に非付着骨髄細胞をのせ、24ウェルプレートに置き、上記と同様に7日間培養した。スライスは反射電子 (backscattered electron) 顕微鏡により以前記載したようにして観察した (Amano, H. et al. 1998. J. Bone Miner. Res. 13:846)。

【0046】これまでの知見 (Yasuda, H et al. 1998. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95:3597; Lacey, D.L. et al. 1998. Cell. 93:165) と一致して、rhM-CSF または rhRANKL が単独で存在しても、TRAP陽性細胞は認められなかった。rhVEGF165 単独でも破骨細胞の分化を支持できなかった (図3A)。rhVEGF165 と rhRANKL の組み合

わせは、TRAP陽性細胞の生成を支持した (図3B)。その細胞のサイズは、rhM-CSF と rhRANKL の存在下で生成された細胞と比べ有意に小さかった (図3C)。結果として、rhVEGF165 と rhRANKL により支持された破骨細胞は、rhM-CSF と rhRANKL によるものに比べ、小さな吸収窩を形成した (図3Dおよび3E)。これらの結果から、VEGF は確かに ODF / OPGL / TRANCE / RANKL と共同して破骨細胞を分化を支持できることが実証された。

【0047】[実施例5] 加齢に伴う op/op マウスの破骨細胞増加における内因性 VEGF の効果

本実施例では、加齢と共に op/op マウスの破骨細胞が増加し、骨大理石病が改善する (Marks, S.C., Jr., and P.W. Lane. 1976. J. Hered. 67:11; Marks, S.C., Jr. 1982. Am. J. Anat. 163:157; Begg, S.K. et al. 1993. J. Exp. Med. 177:237) のは、内因的に産生される VEGF によるものなのかを調べた。2ヵ月齢の op/op マウスに $100 \mu\text{g}$ のヤギ抗マウス VEGF ポリクローナル抗体 (R&D Systems) を12時間おきに5回連続的に投与した。対照として、ヤギ IgG (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) を上記と同様に投与した。別の群のマウスには、 $5 \mu\text{g}$ の rhVEGF165 の単回投与を行った。これらすべてのマウスは、処理の開始3日後に屠殺した。

【0048】加齢の進んだマウスの大腿骨切片の大きさは幼若マウスの約1.6倍であったが、図4Aに示すように、2週齢の op/op マウスの大腿骨 (表1および3) に比べ、2ヵ月齢の op/op マウス (28 ± 1 破骨細胞/切片) では有意に多数の2~3核の小さな破骨細胞が観察された。それに加えて、骨髓 (marrow space) には TRAP 陽性の単核細胞がしばしば観察された。

【0049】 $100 \mu\text{g}$ のヤギ抗 VEGF ポリクローナル抗体を12時間おきに5回投与したところ、破骨細胞数は有意に減少した (4 ± 2 破骨細胞/切片) (図4B)。ヤギ IgG の投与では破骨細胞数に変化はなかった。2週齢の変異マウス (表2) のときと同様に VEGFR-1/Fc を投与したところ、破骨細胞数に変化は認められなかった。 $5 \mu\text{g}$ の rhVEGF165 の1回の投与は破骨細胞をさらに形成させた (64 ± 5 破骨細胞/切片) (図4C) ことは、2ヵ月齢の op/op マウスの大腿骨の VEGF レベルは、破骨細胞を最大限形成するにはまだ不十分であることを示している。これらの結果から、機能的な M-CSF を欠損する op/op マウスにおいて、VEGF は自発的な破骨細胞の形成を引き起こすことが実証された。加齢に伴い破骨細胞数が増加することや、2週齢マウスと2ヵ月齢マウスで内因性 VEGF を中和するのに必要な VEGFR-1/Fc の量が異なることから、加齢の進んだマウスで VEGF 産生のレベルが上昇していることが示唆される。ただし、破骨細胞前駆細胞の VEGF に対する感受性が加齢によって変化している可能性は否定できない。

【0050】[実施例6] VEGF によって誘導された破骨細胞の微細形態

上記のように、op/op マウスに遺伝子組換え型ヒト VEGF

(rhVEGF)を投与すると、破骨細胞の形成機能が回復し、osteopetrosisの症状は改善された。このことは、rhVEGFで誘導された破骨細胞はその機能も回復していることを示唆している。そこで、この実験系で誘導された破骨細胞を微細形態学的に確認するため、電子顕微鏡による観察を行った。op/opマウスに5 μ g/bodyのrhVEGFを腹腔投与して4日後、op/opマウスを2%パラホルムアルデヒド-2%グルタルアルデヒド (in 0.1M cacodylate buffer, pH7.4) で灌流固定をし、大腿骨を摘出後1%オスミウム酸による後固定を施した。その後10%EDTAで2週間の脱灰を行い、骨組織をEpon812樹脂に包埋をし、電顕試料とした。

【0051】VEGFで誘導した破骨細胞は小型で核数の少ないものがほとんどであったが、骨面に接する側に発達した波状縁 (ruffled border: 図5, rb) とそれを取り囲む明帯 (clear zone: 図5, cz) が認められる。また、細胞質中には多数のミトコンドリア (mt) が観察され、それらの間にはゴルジ装置が観察され活発な破骨細胞の特色が示されていた。これらの所見からVEGFによって誘導された破骨細胞は小型であるがその機能を満たすべく形態学的特長を有していることが示された。

【0052】[実施例7] VEGFの成熟破骨細胞に対する活性効果についての検討

成熟破骨細胞に対してのVEGFの効果を調べるため、単離した成熟破骨細胞を用いた培養系で実験を行った。破骨細胞の単離はChambersら (Chambers T.J. and Magnus C. J.: J. Pathology 136, 27-39, 1982) の方法に準じ、ラット下肢骨より採取した。概略を説明すると生後1日齢Wistar系ラットを断頭屠殺し、左右頸骨、大腿骨を取り出し、M199培地を入れたシャーレに入れて、外科用メスを用いて筋肉等骨付着物を除去した。新しいM199培地中に骨をさらに細かく切り刻み、その上清 (骨系細胞を含むけん濁液) を集め、遠心により骨系細胞を得た。この骨系細胞に25mM HEPES buffer (pH7.0) で調整した10%FBSを含むM199培地で再びけん濁させ、カバースリップに乗せ、恒温培養器にて、37°C、大気中、1時間付着させた。10%FBSを含むM199培地で洗い、破骨細胞とその前駆細胞を接着性の差により骨芽細胞など他の細胞より単離した。この単離した破骨細胞は15%FBSを含むIB培地にて培養した。この培養系に対し20ng/mlのM-CSFを添加した群と100ng/mlのVEGFを添加した群でそれぞれの反応を比較観察した。

【0053】単離して培養液の中に移した破骨細胞は比較的小型の細胞形態を示していた (図6a)。M-CSF添加群では、添加直後から細胞の伸展がはじまり、細胞同士の融合も観察された。伸展は細胞周囲全体で起こっていた。添加1分後には多数の核を有する大型の細胞に変化した (図6b)。さらに、30分、60分と経過してもその形態に変化は見られなかった (図6c-d)。一方、VEGF添加群では、添加から10分経過してもまったく変化は見

られず (図6f)、添加から20分経過したところで細胞周囲の一部に伸展が観察された (図6g、矢印)。さらに60分後にはその伸展がより明瞭になった (図6h、矢印)。In vitroにおける破骨細胞の伸展現象は骨吸収機能の活性と相同しているという考えもあることから、VEGFは、M-CSFのような即効性はないものの成熟破骨細胞に対して緩やかに作用して骨吸収機能を発現することを示唆した。この現象はop/opマウスでは破骨細胞が加齢とともに少しずつ出現してくること、しかもその細胞が小型であることと深い関連があることを示唆している。

【0054】

【発明の効果】本発明により、VEGFR-1が破骨細胞の形成や生存、ならびに骨吸収に密接に関わっていることが明らかになった。また、VEGFR-1の活性化を制御することにより、破骨細胞の形成や生存を調節し、骨吸収を制御するための新しい方法および薬剤が提供された。また本発明により、骨吸収を制御する新規な化合物をスクリーニングする方法が提供された。本発明の薬剤は、骨吸収の異常を伴う種々の疾患の予防や治療に用いられる。また、VEGFR-1やそのリガンドであるVEGFおよびPlGF-1の発現量は、骨代謝に深く関わることから、これらの蛋白質レベルの検査などを通して骨代謝の異常を診断することも考えられる。また、本発明のスクリーニング方法により、血管誘導を制御する薬剤をスクリーニングすることも可能である。

【図面の簡単な説明】

【図1】大腿骨切片のVEGFRに対する免疫組織化学染色を示す図である。3週齢+/+マウス的大腿骨の縦断切片を、抗VEGFR-1ポリクローナル抗体 (A)、AVAS12抗VEGFR-2モノクローナル抗体 (B)、またはウサギIgG (C) で染色した。矢尻は破骨細胞を示し、矢印は内皮細胞を示している。倍率238倍。

【図2】内因性VEGFまたは外来性rhM-CSFの支持による破骨細胞のop/opマウス大腿骨小柱の骨吸収を示す図である。マウスの処理は12日齢から開始し、19日齢で屠殺した。大腿骨の縦断切片をMalloryのアザンで染色した。各顕微鏡写真は3個体から得た大腿骨の群を示している。(A) 未投与；(B) 12日齢に5 μ gのrhM-CSFを1回投与；(C) 12日齢に5 μ gのrhM-CSFを1回投与し、16~18日齢にVEGFR-1/Fcキメラ蛋白質とrhM-CSFを各5 μ g、12時間おきに6回連続的に投与。倍率は20倍。

【図3】破骨細胞のインビトロ生成を支持するVEGFの能力を示す図である。非付着骨髄細胞を、96ウェルプレート (A~C) または象牙質スライス (D,E) 上で、rhVEGF165単独 (A)、rhVEGF165とrhRANKL (BおよびD)、またはrhM-CSFとrhRANKL (CおよびE) の存在下で7日間培養した。培養物はTRAP活性による染色 (A~C)、または反射電子顕微鏡を用いた観察を行った (D,E)。(D) 中の矢印は小吸収窩を示している。倍率24倍 (A~C)。(D) と (E) のバーは、50 μ mである。

【図4】2ヶ月齢op/opマウス大腿骨における、内因的に産生されるVEGFに対する破骨細胞の依存性を示す図である。マウスは処理開始3日後に屠殺した。大腿骨の縦断切片をTRAP活性により染色し、ヘマトキシリンでカウンター染色を行った。各顕微鏡写真は、3個体から得た大腿骨の群を示している。(B)中の矢印は、単核のTRAP陽性細胞を示している。(A)未投与；(B)12時間おきに連続的に5回、100 μ gの抗VEGFポリクローナル抗体を投与；(C)5 μ gのrhVEGF165を1回投与。倍率103倍。

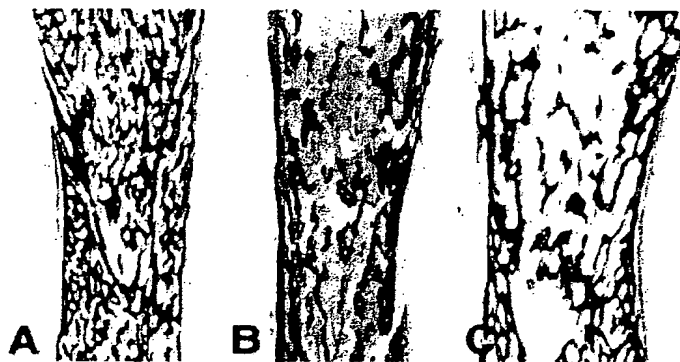
【図5】VEGFによって誘導された破骨細胞の微細形態を示す図である。op/opマウスにrhVEGFを腹腔内投与して4日後の大腿骨を摘出し電顕観察を行った。骨(Bon * e)、核(Nu)、ミトコンドリア(mt)、波状縁(ruffled border: rb)、および明帯(clear zone: cz)を示した。

【図6】成熟破骨細胞に対するVEGFの活性効果を示す図である。生後1日齢ラット下肢骨より破骨細胞を単離し、15%FBSを含むIB培地にて培養した。この培養系に対し20ng/mlのM-CSFを添加した群と100ng/mlのVEGFを添加した群でそれぞれの反応を比較観察した。M-CSF添加前(a)および添加後1(b)、30(c)、および60(d)分後、VEGF添加前(e)、および添加後10(f)、20(g)、および60(h)分後の破骨細胞(oc)を示す。

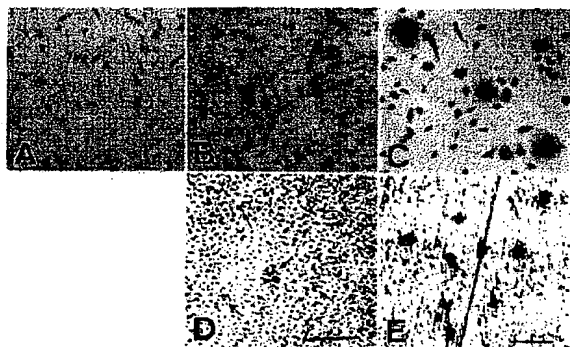
【図1】



【図2】



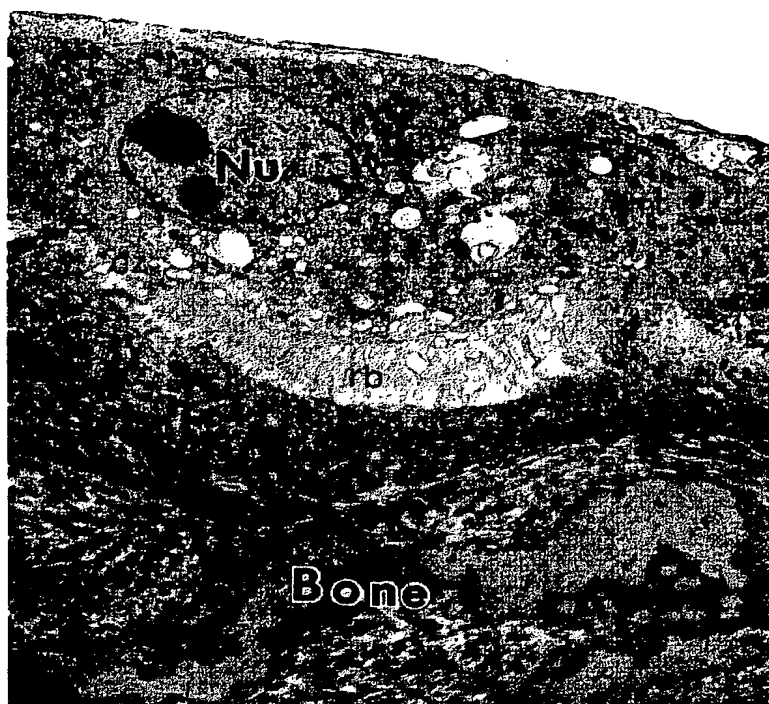
【図3】



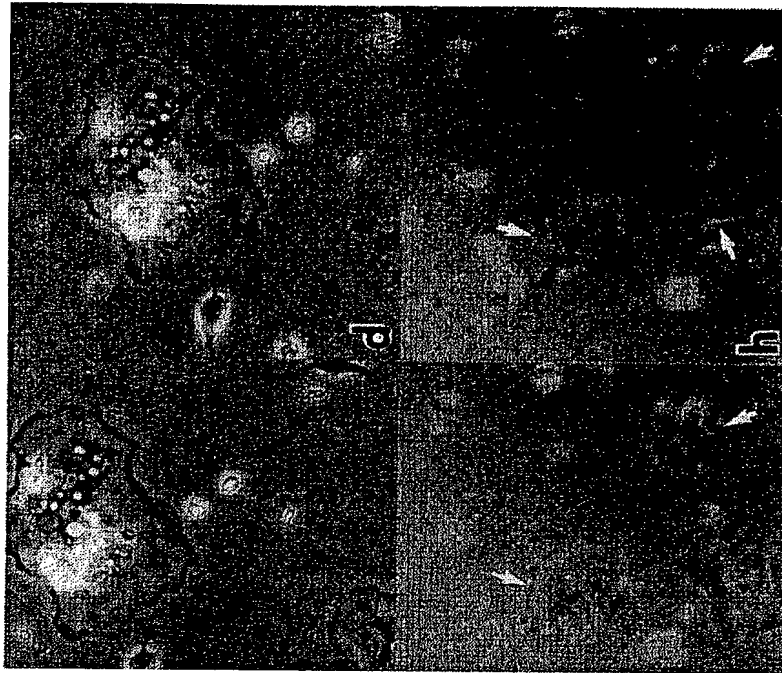
【図4】



【図5】



【図6】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.	識別記号	F I	ターマコード (参考)
A 6 1 P 35/00		A 6 1 P 43/00	1 0 1
43/00	1 0 1		1 0 5
	1 0 5	C 1 2 Q 1/04	
C 1 2 Q 1/04		G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15		33/50	Z
33/50			X
		33/566	
33/566		A 6 1 K 37/24	

(72)発明者 前田 憲彦
 広島県広島市東区牛田本町6丁目1-9-
 305

【正誤表】

【公開番号】

特開2001-78603 (P2001-78603A)
特開2001-57867 (P2001-57867A)
特開2001-86982 (P2001-86982A)
特開2001-37932 (P2001-37932A)
特開2001-70221 (P2001-70221A)
特開2001-104325 (P2001-104325A)
特開2001-17977 (P2001-17977A)
特開2001-38327 (P2001-38327A)
特開2001-104907 (P2001-104907A)
特開2001-104974 (P2001-104974A)
特開2001-47112 (P2001-47112A)
特開2001-38821 (P2001-38821A)
特開2001-62832 (P2001-62832A)
特開2001-121648 (P2001-121648A)
特開2001-97172 (P2001-97172A)
特開2001-97173 (P2001-97173A)
特開2001-97174 (P2001-97174A)
特開2001-97175 (P2001-97175A)
特開2001-97176 (P2001-97176A)
特開2001-80578 (P2001-80578A)
特開2001-80579 (P2001-80579A)
特開2001-39410 (P2001-39410A)
特開2001-114244 (P2001-114244A)
特開2001-114349 (P2001-114349A)
特開2001-122258 (P2001-122258A)
特開2001-122359 (P2001-122359A)
特開2001-122360 (P2001-122360A)
特開2001-122433 (P2001-122433A)
特開2001-19593 (P2001-19593A)
特開2001-19594 (P2001-19594A)
特開2001-26408 (P2001-26408A)
特開2001-72976 (P2001-72976A)
特開2001-107194 (P2001-107194A)

第1部門(1)

正 誤 表

(平成13年8月21日(2001.8.21)発行)

特 許 公開番号	分 類	識別 記号	箇所	誤	正
2001- 78603	A01H 5/00		適用条文	脱落	特許法第30条第1項の適用申請あり 1999年3月20日、日本植物生理学会発表の日本植物生理学会1999年度年会および第39回シンポジウム講演要旨集にて発表

第1部門(1)

出願人の名義変更

(平成13年8月21日(2001.8.21)発行)

特 許 公開番号	分 類	識別 記号	出願番号	旧出願人及び代理人	新出願人及び代理人
2001- 57887	A23L 1/30		平11-234971	599118126 株式会社ジェー・シー・ビー 岡山県岡山市藤原西町2丁目 2番12号 397067244 嘉島 康二 静岡県富士市中島358-1- 101 代理人 100061642 福田 武通 (外2名)	599118126 株式会社ジェー・シー・ビー 岡山県岡山市藤原西町2丁目 2番12号 397067244 嘉島 康二 静岡県富士市中島358-1- 101 上記2名代理人 100061642 福田 武通 (外2名) 594192235 林 肇輝 岡山県岡山市藤原西町2丁目 2-12 上記1名代理人 100082659 福田 賢三 (外2名)
2001- 86982	C12N 5/02		2000-191075	599100545 新飯田 俊平 広島県広島市南区宇品神田3 丁目8-24-301 000203254 村上 和雄 茨城県つくば市観音台1丁目 37-16 代理人 100102978 清水 初志 (外1名)	599100545 新飯田 俊平 広島県広島市南区宇品神田3 丁目8-24-301 000203254 村上 和雄 茨城県つくば市観音台1丁目 37-16 500330197 石塚 保行 神奈川県川崎市麻生区虹ヶ丘 1-11-3 代理人 100102978 清水 初志 (外1名)
上記は出願公開前に承継されたものである。					

第1部門(2)

出願人の名義変更

(平成13年8月21日(2001.8.21)発行)

特 許 公開番号	分 類	識別 記号	出願番号	旧出願人及び代理人	新出願人及び代理人
2001- 37932	A63B 57/00		2000-208397	500324369 チャン、ヒュン スー 大韓民国、ソウル、カンナン ーク、ゲボードン649、キョン ナンアパートメント9-906 代理人 100091498 渡邊 勇 (外1名)	500516045 イレ ケミカル エルティー ディー 大韓民国、ソウル、カンナン ーク、ヨクサンードン、641- 11 代理人 100091498 渡邊 勇 (外1名)
2001- 70221	A47L 16/42		平11-232327	599116498 有限会社バラエティーボック ス 東京都八丈島八丈町三根35番 地6 代理人 100080056 西郷 義美	501068145 加藤 章子 東京都八丈島八丈町三根35番 地6 代理人 100080056 西郷 義美
2001-104325	A61B 17/58		2000-264740	500239373 ハウメディカ・オステオニク ス・コーポレイション アメリカ合衆国ニュージャ ージー州07401-1677、アレンデ イル、ルート・17・59 代理人 100099623 奥山 尚一 (外2名)	500520330 ストライカー・スピン・ソシ エテ・アノニム フランス国、33610 セスタ、 ゼドイ・マルティコ(番地無 し) 代理人 100099623 奥山 尚一 (外2名)
上記は出願公開前に承継されたものである。					

第2部門(1)

出願人の名義変更

(平成13年8月21日(2001.8.21)発行)

特 許 公開番号	分 類	識別 記号	出願番号	旧出願人及び代理人	新出願人及び代理人
2001- 17977	C02F 1/469		平11-190312	393017535 コスモ食品株式会社 東京都中央区日本橋小伝馬町 12番2号 代理人 100107984 廣田 雅紀	393017535 コスモ食品株式会社 東京都中央区日本橋小伝馬町 12番2号 593075544 株式会社共和テクノス 千葉県山武郡芝山町小池2759 - 3 代理人 100107984 廣田 雅紀
2001- 38327	B09B 3/00		平11-220460	591184161 株式会社エヌ・ティ・ティエ ムイー 東京都千代田区大手町二丁目 2番2号 代理人 100085475 植田 茂樹	596094692 株式会社エヌ・ティ・ティ エムイー 東京都千代田区大手町二丁目 2番2号 代理人 100085475 植田 茂樹
2001-104907	B09B 1/00		平11-288678	000140982 株式会社間組 東京都港区北青山2丁目5番 8号 000176785 三菱建設株式会社 東京都中央区日本橋本町3丁 目3番6号 000140292 株式会社奥村組 大阪府大阪市阿倍野区松崎町 2丁目2番2号 391000508 大容基功工業株式会社 高知県高知市塩田町1番6号	000140982 株式会社間組 東京都港区北青山2丁目5番 8号 000176785 三菱建設株式会社 東京都中央区日本橋本町3丁 目3番6号 000140292 株式会社奥村組 大阪府大阪市阿倍野区松崎町 2丁目2番2号 391000508 大容基功工業株式会社 高知県高知市塩田町1番6号
上記は出願公開前に承継されたものである。					

第2部門(1)

出願人の名義変更

(平成13年8月21日(2001.8.21)発行)

特 許 公開番号	分 類	識別 記号	出願番号	旧出願人及び代理人	新出願人及び代理人
				000219598 東海コンクリート工業株式会 社 愛知県名古屋市港区潮風町 (十号地) 592093833 青山機工株式会社 東京都港区北青山2丁目5番 8号 391051049 株式会社エステック 大阪府大阪市大正区南畠加島 7丁目1番55号 390036467 成幸工業株式会社 大阪府大阪市中央区大手前1 丁目7番24号 595113554 日本イコス株式会社 東京都新宿区西新宿6丁目18 番10号 000004123 日本鋼管株式会社 東京都千代田区丸の内一丁目 1番2号 591209660 バウアー・ジャパン株式会社 東京都港区南青山2丁目27番 10号 595155060 株式会社ハンシン建設 大阪府大阪市福島区海老江1 丁目1番31号 代理人 100081514 酒井 一	000219598 東海コンクリート工業株式会 社 愛知県名古屋市港区潮風町 (十号地) 592093833 青山機工株式会社 東京都港区北青山2丁目5番 8号 391051049 株式会社エステック 大阪府大阪市大正区南畠加島 7丁目1番55号 390036467 成幸工業株式会社 大阪府大阪市中央区大手前1 丁目7番24号 595113554 日本イコス株式会社 東京都新宿区西新宿6丁目18 番10号 000004123 日本鋼管株式会社 東京都千代田区丸の内一丁目 1番2号 595155060 株式会社ハンシン建設 大阪府大阪市福島区海老江1 丁目1番31号 代理人 100081514 酒井 一
上記は出願公開前に承継されたものである。					

第2部門(1)

出願人の名義変更

(平成13年8月21日(2001.8.21)発行)

特許 公開番号	分類	識別 記号	出願番号	旧出願人及び代理人	新出願人及び代理人
2001-104974	C02F 3/10		平11-286720	397059928 金子織物株式会社 群馬県桐生市東久方町2丁目 1番30号 代理人 100072604 有我 軍一郎	501091899 有限会社トシテックス 群馬県桐生市東久方町2丁目 6番30号 代理人 100072604 有我 軍一郎
上記は出願公開前に承継されたものである。					

第2部門(2)

出願人の名義変更

(平成13年8月21日(2001.8.21)発行)

特 許 公開番号	分 類	識別 記号	出願番号	旧出願人及び代理人	新出願人及び代理人
2001- 47112	B21B 27/03		平11-223214	000005083 日立金属株式会社 東京都港区芝浦一丁目2番1号	000005083 日立金属株式会社 東京都港区芝浦一丁目2番1号 000001258 川崎製鉄株式会社 兵庫県神戸市中央区北本町通 1丁目1番28号 代理人 100099531 小林 英一
上記は出願公開前に承継されたものである。					

特開2001-86982

第2部門(4)

正 誤 表

(平成13年8月21日(2001.8.21)発行)

特 許 公開番号	分 類	識別 記号	箇所	誤	正
2001- 38821	B29D 30/20		優先権	脱落	優先権主張番号 9809594 優先日 1998年7月23日 (1998.7.23) 優先権主張国フランス(F R)

第2部門(4)

出願人の名義変更

(平成13年8月21日(2001.8.21)発行)

特 許 公開番号	分 類	識別 記号	出願番号	旧出願人及び代理人	新出願人及び代理人
2001- 62832	B29B 17/02		平11-243293	390022909 アイン・エンジニアリング株式会社 東京都品川区西五反田1丁目 32番2号 000241441 豊田化工株式会社 愛知県名古屋市中村区名駅4 丁目7番23号 代理人 100081695 小倉 正明	390022909 アイン・エンジニアリング株式会社 東京都品川区西五反田1丁目 32番2号 000241500 豊田紡織株式会社 愛知県刈谷市豊田町1丁目1 番地 代理人 100081695 小倉 正明
2001-121648	B32B 15/08		平11-303909	598119290 堤 陽太郎 神奈川県横浜市栄区笠間町285 代理人 100067183 鈴木 郁男	000003768 東洋製罐株式会社 東京都千代田区内幸町1丁目 3番1号 代理人 100067183 鈴木 郁男
上記は出願公開前に承継されたものである。					

第2部門(5)

正 誤 表

(平成13年8月21日(2001.8.21)発行)

特 許 公開番号	分 類	識別 記号	箇所	誤	正
2001- 97172	B60R 21/26		優先権	脱落	優先権主張番号 特願平10-273478 優先日 平成10年9月28日 (1998.09.28) 優先権主張国 日本(JP) 優先権主張番号 特願平10-339934 優先日 平成10年11月30日 (1998.11.30) 優先権主張国 日本(JP) 優先権主張番号 特願平11- 57127 優先日 平成11年3月4日 (1999.03.04) 優先権主張国 日本(JP) 優先権主張番号 特願平11- 78306 優先日 平成11年3月23日 (1999.03.23) 優先権主張国 日本(JP) 優先権主張番号 特願平11-265995 優先日 平成11年9月20日 (1999.09.20) 優先権主張国 日本(JP) 優先権主張番号 特願平11-265996 優先日 平成11年9月20日 (1999.09.20) 優先権主張国 日本(JP) 優先権主張番号 特願平11-265997 優先日 平成11年9月20日 (1999.09.20) 優先権主張国 日本(JP)

第2部門(5)

正 誤 表

(平成13年8月21日(2001.8.21)発行)

特 許 公開番号	分 類	識別 記号	箇 所	誤	正
2001- 97173	B60R 21/26		優先権	脱落	<p>優先権主張番号 特願平11-265998 優先日 平成11年9月20日 (1999.09.20) 優先権主張国 日本(JP) 優先権主張番号 特願平11-265999 優先日 平成11年9月20日 (1999.09.20) 優先権主張国 日本(JP)</p> <p>優先権主張番号 特願平10-273478 優先日 平成10年9月28日 (1998.09.28) 優先権主張国 日本(JP) 優先権主張番号 特願平10-339934 優先日 平成10年11月30日 (1998.11.30) 優先権主張国 日本(JP) 優先権主張番号 特願平11- 57127 優先日 平成11年3月4日 (1999.03.04) 優先権主張国 日本(JP) 優先権主張番号 特願平11- 78306 優先日 平成11年3月23日 (1999.03.23) 優先権主張国 日本(JP) 優先権主張番号 特願平11-265995 優先日 平成11年9月20日 (1999.09.20) 優先権主張国 日本(JP)</p>

第2部門(5)

正 誤 表

(平成13年8月21日(2001.8.21)発行)

特 許 公開番号	分 類	識別 記号	箇所	誤	正
2001- 97174	B60R 21/26		優先権	脱落	優先権主張番号 特願平11-265996 優先日 平成11年9月20日 (1999.09.20) 優先権主張国 日本(J P) 優先権主張番号 特願平11-265997 優先日 平成11年9月20日 (1999.09.20) 優先権主張国 日本(J P) 優先権主張番号 特願平11-265998 優先日 平成11年9月20日 (1999.09.20) 優先権主張国 日本(J P) 優先権主張番号 特願平11-265999 優先日 平成11年9月20日 (1999.09.20) 優先権主張国 日本(J P) 優先権主張番号 特願平10-273478 優先日 平成10年9月28日 (1998.09.28) 優先権主張国 日本(J P) 優先権主張番号 特願平10-339934 優先日 平成10年11月30日 (1998.11.30) 優先権主張国 日本(J P) 優先権主張番号 特願平11- 57127 優先日 平成11年3月4日 (1999.03.04) 優先権主張国 日本(J P)

第2部門(5)

正 誤 表

(平成13年8月21日(2001.8.21)発行)

特 許 公開番号	分 類	識別 記号	箇所	誤	正
2001- 97175	B60R 21/26		優先権	脱落	<p>優先権主張番号 特願平11- 78306 優先日 平成11年 3月23日 (1999.03.23) 優先権主張国 日本(J P) 優先権主張番号 特願平11-265995 優先日 平成11年 9月20日 (1999.09.20) 優先権主張国 日本(J P) 優先権主張番号 特願平11-265996 優先日 平成11年 9月20日 (1999.09.20) 優先権主張国 日本(J P) 優先権主張番号 特願平11-265997 優先日 平成11年 9月20日 (1999.09.20) 優先権主張国 日本(J P) 優先権主張番号 特願平11-265998 優先日 平成11年 9月20日 (1999.09.20) 優先権主張国 日本(J P) 優先権主張番号 特願平11-265999 優先日 平成11年 9月20日 (1999.09.20) 優先権主張国 日本(J P) 優先権主張番号 特願平10-273478 優先日 平成10年 9月28日 (1998.09.28) 優先権主張国 日本(J P)</p>

第2部門(5)

正 誤 表

(平成13年8月21日(2001.8.21)発行)

特 許 公開番号	分 類	識別 記号	箇所	誤	正
					優先権主張番号 特願平10-339934 優先日 平成10年11月30日 (1998.11.30) 優先権主張国 日本(JP) 優先権主張番号 特願平11- 57127 優先日 平成11年3月4日 (1999.03.04) 優先権主張国 日本(JP) 優先権主張番号 特願平11- 78306 優先日 平成11年3月23日 (1999.03.23) 優先権主張国 日本(JP) 優先権主張番号 特願平11-265995 優先日 平成11年9月20日 (1999.09.20) 優先権主張国 日本(JP) 優先権主張番号 特願平11-265996 優先日 平成11年9月20日 (1999.09.20) 優先権主張国 日本(JP) 優先権主張番号 特願平11-265997 優先日 平成11年9月20日 (1999.09.20) 優先権主張国 日本(JP) 優先権主張番号 特願平11-265998 優先日 平成11年9月20日 (1999.09.20) 優先権主張国 日本(JP)

第2部門(5)

正 誤 表

(平成13年8月21日(2001.8.21)発行)

特 許 公開番号	分 類	識別 記号	箇所	誤	正
2001- 97176	B60R 21/26		優先権	脱落	<p>優先権主張番号 特願平11-265999 優先日 平成11年9月20日 (1999.09.20) 優先権主張国 日本(JP)</p> <p>優先権主張番号 特願平10-273478 優先日 平成10年9月28日 (1998.09.28) 優先権主張国 日本(JP)</p> <p>優先権主張番号 特願平10-339934 優先日 平成10年11月30日 (1998.11.30) 優先権主張国 日本(JP)</p> <p>優先権主張番号 特願平11- 57127 優先日 平成11年3月4日 (1999.03.04) 優先権主張国 日本(JP)</p> <p>優先権主張番号 特願平11- 78306 優先日 平成11年3月23日 (1999.03.23) 優先権主張国 日本(JP)</p> <p>優先権主張番号 特願平11-265995 優先日 平成11年9月20日 (1999.09.20) 優先権主張国 日本(JP)</p> <p>優先権主張番号 特願平11-265996 優先日 平成11年9月20日 (1999.09.20) 優先権主張国 日本(JP)</p>

第2部門(5)

正 誤 表

(平成13年8月21日(2001.8.21)発行)

特 許 公開番号	分 類	識別 記号	箇所	誤	正
					優先権主張番号 特願平11-265997 優先日 平成11年9月20日 (1999.09.20) 優先権主張国 日本(J P) 優先権主張番号 特願平11-265998 優先日 平成11年9月20日 (1999.09.20) 優先権主張国 日本(J P) 優先権主張番号 特願平11-265999 優先日 平成11年9月20日 (1999.09.20) 優先権主張国 日本(J P)

第2部門(5)

出願人の名義変更

(平成13年8月21日(2001.8.21)発行)

特許 公開番号	分類	識別 記号	出願番号	旧出願人及び代理人	新出願人及び代理人
2001- 80578	B63H 1/20		2000-238964	590006033 ベーター ミュラー スイス国 アドリスヴィル イーゼングルント 9 100061815 矢野 敏雄 (外4名)	501030946 ネイシック ホールディング ソシエテ アノニム ルクセンブルグ国 ヴァル スト クロワル 7 100061815 矢野 敏雄 (外4名)
2001- 80579	B63H 3/10		2000-238963	590006033 ベーター ミュラー スイス国 アドリスヴィル イーゼングルント 9 100061815 矢野 敏雄 (外4名)	501030946 ネイシック ホールディング ソシエテ アノニム ルクセンブルグ国 ヴァル スト クロワル 7 100061815 矢野 敏雄 (外4名)
上記は出願公開前に承継されたものである。					

第2部門(6)

出願人の名義変更

(平成13年8月21日(2001.8.21)発行)

特許 公開番号	分類	識別 記号	出願番号	旧出願人及び代理人	新出願人及び代理人
2001-39410	B65B 35/36		2000-136325	000152284 株式会社南部電機製作所 京都府長岡京市勝竜寺八ノ坪 1番地6 代理人 100098095 高田 武志	597017812 株式会社ナベル 京都府長岡京市勝竜寺八ノ坪 1番地6
2001-114244	B65D 1/02		平11-289874	598119290 堤 陽太郎 神奈川県横浜市栄区笠間町285 代理人 100102299 芳村 武彦	000003768 東洋製罐株式会社 東京都千代田区内幸町1丁目 3番1号 代理人 100102299 芳村 武彦
2001-114349	B65D 81/26		平11-289875	598119290 堤 陽太郎 神奈川県横浜市栄区笠間町285 代理人 100102299 芳村 武彦	000003768 東洋製罐株式会社 東京都千代田区内幸町1丁目 3番1号 代理人 100102299 芳村 武彦
2001-122258	B65D 8/16		平11-305782	598119290 堤 陽太郎 神奈川県横浜市栄区笠間町285 代理人 100067183 鈴木 郁男	000003768 東洋製罐株式会社 東京都千代田区内幸町1丁目 3番1号 代理人 100067183 鈴木 郁男
2001-122359	B65D 83/06		平11-303555	598119290 堤 陽太郎 神奈川県横浜市栄区笠間町285 代理人 100102299 芳村 武彦	000003768 東洋製罐株式会社 東京都千代田区内幸町1丁目 3番1号 代理人 100102299 芳村 武彦
上記は出願公開前に承継されたものである。					

第2部門(6)

出願人の名義変更

(平成13年8月21日(2001.8.21)発行)

特 許 公開番号	分 類	識別 記号	出願番号	旧出願人及び代理人	新出願人及び代理人
2001-122360	B65D 83/06		平11-305628	598119290 堤 陽太郎 神奈川県横浜市栄区笠間町285 代理人 100102299 芳村 武彦	000003768 東洋製罐株式会社 東京都千代田区内幸町1丁目 3番1号 代理人 100102299 芳村 武彦
上記は出願公開前に承継されたものである。					

第2部門(7)

出願人の名義変更

(平成13年8月21日(2001.8.21)発行)

特 許 公開番号	分 類	識別 記号	出願番号	旧出願人及び代理人	新出願人及び代理人
2001-122433	B65G 47/84		平11-297733	598119290 堤 陽太郎 神奈川県横浜市栄区笠間町285 代理人 100092200 大城 重信 (外2名)	000003768 東洋製罐株式会社 東京都千代田区内幸町1丁目 3番1号 代理人 100092200 大城 重信 (外2名)
上記は出願公開前に承継されたものである。					

第3部門(1)

出願人の名義変更

(平成13年8月21日(2001.8.21)発行)

特 許 公開番号	分 類	識別 記号	出願番号	旧出願人及び代理人	新出願人及び代理人
2001- 19593	C30B 29/06		平11-187862	397064944 株式会社住友シチックス尼崎 兵庫県尼崎市東浜町1番地 代理人 100059373 生形 元重 (外1名)	000002118 住友金属工業株式会社 大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号 代理人 100059373 生形 元重 (外1名)
2001- 19594	C30B 29/06		平11-188135	397064944 株式会社住友シチックス尼崎 兵庫県尼崎市東浜町1番地 代理人 100059373 生形 元重 (外1名)	000002118 住友金属工業株式会社 大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号 代理人 100059373 生形 元重 (外1名)
2001- 26408	C01B 25/32		平11-201480	591030983 科学技術庁無機材質研究所長 茨城県つくば市並木1丁目1番地 000203656 多木科学株式会社 兵庫県加古川市別府町緑町2番地 代理人 100059694 安達 光雄 (外2名)	301000022 文部科学省無機材質研究所長 茨城県つくば市並木一丁目1番 000203656 多木科学株式会社 兵庫県加古川市別府町緑町2番地 代理人 100059694 安達 光雄 (外2名)
上記は出願公開前に承継されたものである。					

第3部門(3)

出願人の名義変更

(平成13年8月21日(2001.8.21)発行)

特 許 公開番号	分 類	識別 記号	出願番号	旧出願人及び代理人	新出願人及び代理人
2001- 72976	C09K 19/42		平11-254489	000004260 株式会社デンソー 愛知県刈谷市昭和町1丁目1 番地 代理人 100100022 伊藤 洋二 (外2名)	000004260 株式会社デンソー 愛知県刈谷市昭和町1丁目1 番地 上記1名代理人 100100022 伊藤 洋二 (外2名) 000215796 帝国化学産業株式会社 大阪府大阪市西区北堀江1丁 目1番18号
上記は出願公開前に承継されたものである。					

第3部門(4)

出願人の名義変更

(平成13年8月21日(2001.8.21)発行)

特許 公開番号	分類	識別 記号	出願番号	旧出願人及び代理人	新出願人及び代理人
2001-107194	C22C 38/00		平11-277360	393022366 日本シリコロイ工業株式会社 兵庫県川辺郡猪名川町原字芝 脇287-23 代理人 100083585 穂上 照忠 (外1名)	592074049 呉羽製鋼株式会社 大阪府大阪市西淀川区竹島5 丁目4番41号 代理人 100087941 杉本 修司 (外2名)
上記は出願公開前に承継されたものである。					